

Requested document:	<a href="#">JP57163374 click here to view the pdf document</a>
---------------------	--

## HYPOCHOLESTEROLEMIC FERMENTATION PRODUCT AND MANUFACTURE

Patent Number:

Publication date: 1982-10-07

Inventor(s): RICHIYAADO ERU MONAGAN; ARUFURETSUDO DABURIYU ARUBAATS; KAARU ETSUCHI HOFUMAN; JIYOOJI ARUBAASUUSHIYOONBAAGU; HENRII JIYOSHIYUA; MARIA BII ROPETSU

Applicant(s): MERCK & CO INC

Requested Patent:  [JP57163374](#)

Application Number: JP19820037870 19820310

Priority Number (s): US19790048946 19790615

IPC Classification: A61K31/22; A61K31/35; C07C69/34; C07D309/10; C12P7/62; C12P17/06

EC Classification: C07D309/30, C12P7/62, C12P17/06

Equivalents: AU5901780,  [BG61205](#), JP1319910C, JP1518752C,  [JP56008689](#), JP58016875B, JP63066306B, KR8302438,  [US4231938](#), ZA8003545

---

### Abstract

---

Data supplied from the [esp@cenet](mailto:esp@cenet) database - I2

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

昭57-163374

⑫ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 07 D 309/10  
A 61 K 31/22  
31/35  
C 07 C 69/34  
C 12 P 7/62  
17/06

識別記号  
ADN  
ADN

庁内整理番号  
7169-4C  
6408-4C  
6408-4C  
6556-4H  
6760-4B  
6712-4B ※

⑬ 公開 昭和57年(1982)10月7日  
発明の数 7  
審査請求 未請求

(全 23 頁)

⑭ 低コレステリン血症性酵酇生成物及びその製法

ヤーシイ・ソマーセット・ジョンソン・ロード48

⑮ 特願 昭57-37870  
⑯ 出願 昭55(1980)6月16日  
優先権主張 ⑰ 1979年6月15日 ⑯ 米国(US)  
⑯ 48946  
⑮ 特願 昭55-81281の分割  
⑯ 発明者 リチャード・エル・モナガン  
アメリカ合衆国08873ニュージ

⑰ 出願人 メルク・エンド・カムパニー・インコーポレーテッド  
アメリカ合衆国ニュージャージイ・ローウエイ・イースト・リンクルーン・アヴェニュー126  
⑯ 代理人 弁理士 岡部正夫 外3名  
最終頁に統く

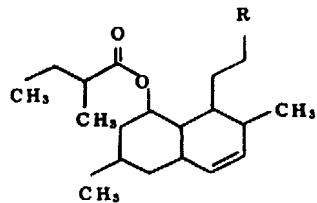
### 明細書

#### 1. 発明の名称

低コレステリン血症性酵酇生成物及びその製法

#### 2. 特許請求の範囲

1. アスペルギルス テレウス (*Aspergillus terreus*) 属の微生物と栄養培地を醸酇せしめ、生成物を単離する事を特徴とする式：



(式中、Rは

を示す)

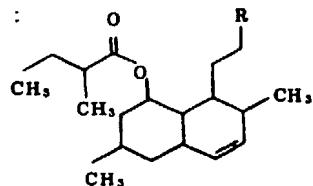
の化合物の製法。

#### 2. 微生物が、アスペルギルス テレウス

(*Aspergillus terreus*) MF-4833 (微生物研菌寄第5232号) 及びアスペルギルス テレウス (*Aspergillus terreus*) MF-4845 (微生物研菌寄第5233号) である特許請求の範囲第1項の方法。

3. 単離が醸酇混合物を溶媒で抽出し、次にクロマトグラフィーを行なう事を特徴としている特許請求の範囲第7項の方法。

#### 4. 式：



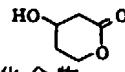
(式中、Rは

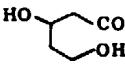
または

の化合物、または、製造的に適当なその塩または、底級アルキルエステル、置換低級

範囲第4項の化合物のエチルエステル。

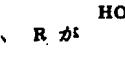
アルキルエステルでその置換基がフェニル、ジメチルアミン、アセチルアミンであるもの。

5. R が  である特許請求の範囲第4項の化合物。

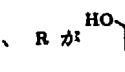
6. R が  である特許請求の範囲第4項の化合物。

第4項の化合物。

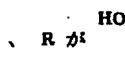
7. カチオンが、アンモニア、エチレンジアミン、N-メチルグルカミン、リジン、アルギニン又はオルニチンである特許請求の範囲第4項の化合物における製薬的に適当な塩。

8. 式中、R が  である特許請求の範囲第4項の化合物のアンモニウム塩。

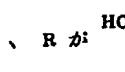
9. 特許請求の範囲第4項の化合物の低級アルキルエステル及び置換低級アルキルエステル。

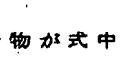
10. 式中、R が  である特許請求の

からなることを特徴とする低コレステリン血症性および抗過脂肪血症性薬剤組成物。

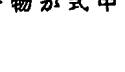
14. 式中、R が  である特許請求の範囲第4項の化合物のアンモニウム塩を化合物とする特許請求の範囲第13項の組成物。

15. 化合物が低級アルキルエステル又は置換低級アルキルエステルである特許請求の範囲第13項の組成物。

16. 式中、R が  である特許請求の範囲第4項の化合物のエチルエステルを化合物とする特許請求の範囲第13項の組成物。

17. 化合物が式中、R が  である特

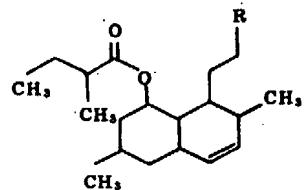
許請求の範囲第4項の化合物である特許請求の範囲第13項の組成物。

18. 化合物が式中 R が  である特

11. 式中、R が  である特許請求の範囲第4項の化合物。

12. 式中、R が  である特許請求の範囲第4項の化合物。

13. 製剤組体及び有効量の式：



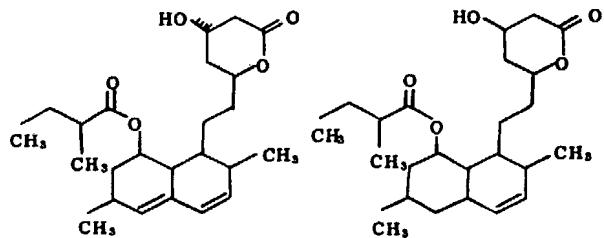
(式中、R は  または  を示す)

の化合物、または、製剤的に適当な塩、または低級アルキルエステル、置換低級アルキルエステルでその置換基が、フェニル、ジメチルアミノ、アセチルアミノのもの、

特許請求の範囲第9項の化合物である特許請求の範囲第13項の組成物。

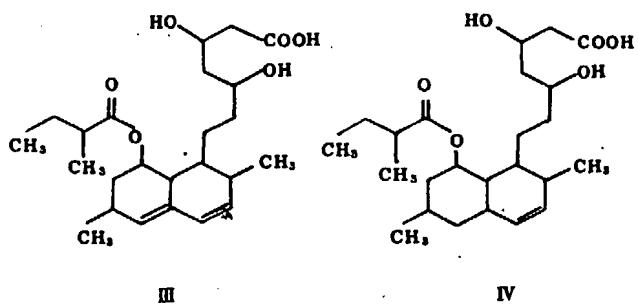
## 3. 発明の詳細な説明

本発明は、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属の培養により得られる低コレステリン血症性生成物に関するもの。更に特異的に記せば、式：



I

II



の化合物のみならず薬剤的に適當なそのカルボン酸塩、低級アルキルエステル、置換アルキルエステルで、置換基が、フェニル、ジメチルアミノ、アセチルアミノ、等であるものに関連している。本発明は又、微生物の培養法及び、上述構造を有する低コレステリン血症性化合物 (*hypocholesteremic compound*) を培地から単離する方法に関連している。これら新化合物はコレステロール生合成を阻害する優良な性質を有しており、高コレステリ

特開昭57-163374(3)

ン血症及び過脂肪血症に対して有益である。

高濃度の血中コレステロールとアテローム性動脈硬化症との間に、可能な関連性があるため、ホニユウ類体中におけるコレステロールを減少させる物質と方法を見出すために多くの努力がなされて来た。これらの方法の一つは、ホニユウ類の体内でコレステロールを合成する能力を阻害する方法である。

近年、エンドー (Endo) 等はペニシリウム (*Penicillium*) 属の培養、培地からの単離により得られる酵素生成物について報告している (U. S. 4,049,495 及び 3,983,140) 彼らは ML 236 B と命名し、関連化合物 236 A、236 C と共にその構造を決定した。この構造は、又 A. G. ブラウン (A. G. Brown), T. C. スメイル (T. C. Smale), T. J. キング (T. J. King) 等によりコンパクチン (compactin) と命名されて報告された。 ( *Journal of Chemical Society* ) (パークイン I ) (Perkin I )

1165 (1975) )。本化合物は、生体内 (*in vivo*) におけるコレステロール生合成の阻害物質である事が発見された。

我々は、エンドー (Endo) 等が用いたものとは異なる微生物、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属の培養によりホニユウ類中のコレステロール生合成の非常に有効な阻害物である新物質を生産せしめ得る事を発見した。我々はさらに、これらの物質は主として上述の構造、I、II、III、IV 及び、微量の複数の他の化合物を特徴とする事を発見した。

本発明の薬剤的に適當な塩とは、ナトリウム、カリウム、アルミニウム、カルシウム、リチウム、マグネシウム、亜鉛、エチレンジアミン、N-メチルグルカミン、リシン、アルギニン、オルニチン、クロリン、N, N'-ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、ジエタノールアミン、プロカイン、N-ベンジル-フエネチルアミン、1-p-クロロベンジル-2-ピロリジン-1'-イル-

メチルベンズイミダゾール、ジエチルアミン、ピペラシン、トリス-(ヒドロキシメチル)アミノメタン、テトラメチルアンモニウム、等のカチオンより製した物を包含する。

本発明の化合物はヒトのアテローム性動脈硬化症、過脂肪血症、あるいは類似した病気の治療における抗過コレステリン血症剤として非常に有効である。本化合物は、カプセル、錠剤、注射剤、等の形で、経口的又は非経口的に投与出来る。経口的使用が通常では、良好である。投与量は、年令、症状の厳しさ、体重、患者のその他の状態により変量出来るが、大人の1日の投与量は約2ミリグラム～2000ミリグラム (良好な量は2～100ミリグラム) の範囲で2回～4回に分けて投与出来る。さらに多量投与は必要に応じて良好に用いる事が出来る。

本発明の化合物は又、有益な抗菌活性を有する。例えば、ペニシリウム SP. (*Penicillium* SP.)、アスペルギルス ニガ- (*Aspergillus*

niger ) 、 クラドスボリウム sp.  
( Cladosporium sp. ) コクリオボラス ミ  
ヤベオルス ( Cochliobolus miyabeanus ) 、  
ヘルミントスボリウム シノドノテイス  
( Helminthosporium cynodnotis ) 等の菌株  
の制御に用いる事が出来る。これらの利用の  
ために、本化合物を適当な処方剤、粉剤、乳  
化剤、水性エタノールの如き溶剤、等に混合  
し、スプレー又は、適応して防御すべき植物  
に粉で振りかける。

本発明の他の形態においては、アスペルギ  
ルス ( Aspergillus ) 属の微生物を培養し、  
その培地から本発明の上述化合物を得る事を  
特徴とする、本発明の化合物の製法に関連し  
ている。分類学によれば、従来、記述されな  
かつた微生物として単離され、同定された本  
アスペルギルスはメルク社 (Merck and Co.,  
Inc.,) ラーウエイ ( Rahway ), N. J. のカ  
ルチャーコレクション ( Culture collection )  
中で、MF-4833 として指定されて来た。

の形態的特徴はアスペルギルス属である微生物と判明された。基本的な権威書、アスペルギ  
ルス ( Aspergillus ) 便覧 "チャーレズトム  
( Charles Thom ) 、ケンネス B ラスパー  
( Kenneth B. Rasper ) 著、ウイリアムスア  
ンドウイルキンス ( Williams and Wilkins )  
社出版、バルチモア ( Baltimore ), Md.,  
1945年) 中に記載された基準を用い既知の  
種と比較して、上述の両菌株がアスペルギ  
ルス テレウス ( Aspergillus terreus ) である  
事が決定された。

本発明の新規化合物を得るために、これらの  
微生物の培養は他の酵素生成物を生産するた  
めに用いられるような培地中で行なう。この  
ような培地中には、微生物が同化出来る炭素  
源、窒素源及び無機塩を含有する。

一般に、グルコース、フルクトース、マル  
トース、シュークロース、キシロース、マン  
ニトール等の糖類の如き炭水化物、オート麦、  
ライ麦、トウモロコシデンプン、トウモロコ

特開昭57-163374(4)

その培養菌は、アメリカンタイプカルチュア  
ーコレクション ( American Type Culture  
Collection ), 12301 パークロンドライ  
ブ ( Parklawn Drive ), ロツクビル  
( Rockville ), マリーランド ( Maryland )  
20852 で永久保管されて来た。受入番号  
ATCC20541 として指定されて来た。他の例  
では、メルクカルチュアーコレクション  
( Merck Culture Collection ) 中で MF-  
4845 として類似微生物が保管されており、  
受入番号 ATCC20542 が与えられている。後  
者の微生物は収量が良い。これらの使用は本  
発明の方法と関連して記載されるが上述菌の  
変異株を含む他のアスペルギルス  
( Aspergillus ) 属も又新規化合物を生産す  
る能力がある。これらの使用は本発明の方法  
を実施する上で計画される。

MF-4833 ( FERM-P5232 ) 、 MF-  
4845 ( FERM-P5233 ) ( 微生物保管委  
託申請書受理番号第 5232 号及び第 5233 号 )

シ粉、等の穀類の如きデンプン、を栄養培地  
中の同化出来る炭素源として单一に、あるいは  
併用して用いる事が出来る。培地中で用い  
る炭水化物の量は培地中の他の成分に依存  
しているが、一般には培地量の 1 ~ 6 重量パ  
ーセントで変量する。これらの炭素源は、個  
個に用いる事が出来るし他の炭素源と併用す  
る事も出来る。一般にタンパク質を含有する  
物質を醸酵工程に窒素源として用いる。適当  
な窒素源としては、イースト加水分解分、一  
次イースト、大豆粉、綿実粉、カゼイン加水  
分解物、トウモロコシ浸出液 ( コーンステイ  
ーブリカ ) 、ディスティラーズソラブルズ  
( distiller's solubles ) 、トマトペースト  
等である、窒素源は单一又は併用して水性培  
地の 0.2 ~ 6 重量パーセントの範囲で用いる。

培地中に取り入れる栄養無機塩は、ナトリ  
ウム、アンモニウム、カルシウム、フォスフ  
エート、サルフェート、クロライド、カーボ  
ネート等のイオンを得る事の出来る通常の塩

類である。又、コバルト、マンガン、鉄、マグネシウム等の微量の金属も含む。

実施例中に記述した培地は単に、種々の使用出来る培地を例示したにすぎず、これを限定するものではない。本発明の新規化合物を生産するのに用いる培地中に用いる炭素源は、デキストローズ、デキストリン、オート麦粉、オート麦微粉、糖みつ、クエン酸塩、大豆油、グリセロール、麦芽エキス、タラ肝油、デンプン、エタノール、無花果 (figs)、アスコルビン酸ナトリウム、ラード、等を包含する。窒素源として、ペプトン化乳、自己分解イースト、イースト RNA、トマトペースト、カゼイン、一次イースト、ビーナツツ粉、ディステイラー・ソラブル (distiller's solubles) トウモロコシ浸出液 (コーンスティーブリカー)、大豆粉、トウモロコシ粉、 $\text{N}_2\text{アミン}$ 、ビーフエキス、アスパラギン、綿実粉、硫酸アンモニウム、等を包含する。主たるイオン性物質としては  $\text{CaCO}_3$ 、

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaCl}$ 、及び少量の  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、等を含む。微量の  $\text{Fe}$ 、 $\text{Mn}$ 、 $\text{Mo}$ 、 $\text{B}$ 、 $\text{Cu}$ 、等も含む。

酵母は、20℃～37℃で行なうが22℃～30℃で行なうのが良好である。アスペルギルス (Aspergillus) を培養し新規化合物を生産する栄養培地のpHは、6.0～8.0に変化出来る。

新化合物は、表面培養及び、浸水培養の両方法により生産されるが、浸水培養が良好である。小規模の酵母においては、適当な栄養培地にアスペルギルス (Aspergillus) 培養菌を接種し、これを生産培地に移し、28℃で数日間振とう培養を行なうのが良好である。

酵母は、培地の滅菌フラスコ中で、1～2段階の種の発育工程により開始する。種発育段階の栄養培地は、炭素及び窒素源を併用出来る。種フラスコは、定温のインキュベーター中で28℃2日間振とうするか、又は、十分に成長するまで振とうする。生長した種を第二の種培地又は生産培地に接種するのに用

いる。中間の種発育工程を用いる場合には、本質的に同様の方法で成長させ、生産培地に接種するために、それを部分的に用いる。接種したフラスコを一定温度で、数日間振とうし、インキュベーションが終つたら、フラスコの含有物を遠心分離又は戻過する。

大量培養の場合には、攪拌機、培地への通気装置を付けた適当なタンクで培養するのが良い。この方法によれば、栄養培地をタンク中で作製出来、120℃まで加熱して滅菌する。冷却後、滅菌培地に、あらかじめ成長せしめてあつた種を接種する。酵母は、28℃で栄養培地を攪拌及び/又は通気して行なう。新規化合物を生産するこの方法は、多量の化合物を得るのに特に良好である。

化合物は、培養液から、ラクトン I、及び II の形で単離出来る。化合物 III、IV のような塩の形で単離出来る。

化合物 I 及び II は  $\text{NaOH}$  のような塩基で加水分解して化合物 III 及び IV のナトリウム塩を

得る事が出来る。薬剤的に適当な他のカチオンによる塩基を用いると対応する塩を得る。これらの塩を注意深く酸性にすればヒドロキシ酸 III、IV を得る。III、IV のようなヒドロキシ酸は酸性 pH で化合物 I 及び II にそれぞれ変換出来る。化合物 I 及び II は酸性又は塩基性触媒の存在下、メタノール、エタノール、ブロパノール、ブタノールと反応せしめるか、又は、フェニル-、ジメチルアミノ-、アセチルアミノアルカノールと反応せしめると、対応する化合物 III 及び IV のエステルを得る。これも本発明の一部である。

化合物 III、IV、特に III はクロマトグラフィーの必要なく、アンモニウム塩の形で都合よく単離出来る。この単離は都合の良いもので、クロマトグラフィーよりも経済的である。さらに III 及び IV の塩は in vitro でコレステロール合成阻害及び抗菌剤としての活性が化合物 I、及び II よりも大きい。実際ヒドロキシル酸 (及びその塩類) は活性型であると考

えられる。さらにこれらの塩は、特に良好な投与形の一つである。アンモニウム塩に加えて、良好な塩としては、テトラメチルアンモニウム及びエチレンジアミン、ナトリウム、カリウム、カルシウム、N-メチル-ゲルカミン、リジン、アルギニン、オルニチン等の塩である。

化合物I (MSD-803) の物理化学的性状は以下に示す。

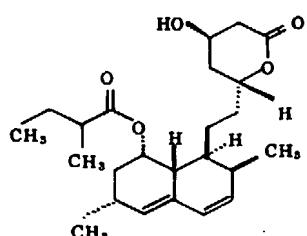
1. <u>融点</u>	170~171°C
2. <u>分子量</u> (マススペクトル)	404
3. <u>分子式</u>	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>6</sub>
(マススペクトル による実測値)	404、2555
計算値)	404、2563
4. <u>UVスペクトル</u> (アセトニトリル中)	<u>マキシマム</u>
	230.5 nm (E% 505.7)
	237.5 nm (E% 576.6)
	246 nm (E% 395.2)

る錠剤法を用いて測定第2図に示す。

#### 8. 旋光度

特異的旋光度  $[\alpha]_D^{25} = 320.7^\circ$  は 5.30 ミリグラム/ミリリットル CH<sub>3</sub>CN、溶液中で測定して決定。この値はナトリウム-D-線波長で測定して得られる。

これらのデータ及び他のデータに基づき、本生成物の構造は次式に示す如き立体化学構造を有するものと推察される。



対応するヒドロキシル酸化合物IIIは次の構造を有する。

#### 5. <sup>13</sup>C NMR 化学シフト

スペクトルは CDCl<sub>3</sub> 溶媒中で測定 (0.35 ミリリットル中 20.1 ミリグラム)。化学シフトはテトラメチルシランを内部基準として 0 ppm IC し、これとの比較値。実験条件下で溶媒 (CDCl<sub>3</sub>) のシグナルは 70.0 ppm に発現。マススペクトルデータと一致して 24 個の炭素が観察された。

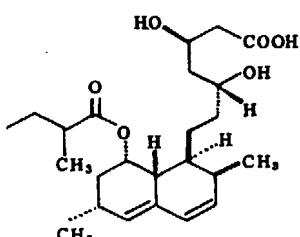
11.5、13.6、16.0、22.6、24.1、26.6、  
27.2、30.5、32.5、32.8、35.9、36.4、  
37.1、38.4、41.3、62.4、67.8、76.4、  
128.4、129.7、131.7、133.2、170.8、  
177.2

#### 6. <sup>1</sup>H NMR スペクトル

スペクトルは CDCl<sub>3</sub> 中で測定。化学シフトは内部基準テトラメチルシランを 0 ppm としこれに比較した ppm 値で第1図に示してある。

#### 7. IR スペクトル

赤外線吸収スペクトルは試料を KBr に上



これらの分子における不齊中心の絶対配置は X-線回折により決定された。

化合物II (MSD-883) の物理化学的性状は次の通りである。

#### 1. 融点

129~131°C

#### 2. 分子量

406

#### 3. 分子式

C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>O<sub>5</sub>

マススペクトル  
による実測値 406、2706

計算値 406、2719

#### 4. <sup>1</sup>H NMR スペクトル

スペクトルは CDCl<sub>3</sub> 中で測定。化学シフト

は内部基準テトラメチルシランを 0 ppm として、比較し図 3 に ppm で示してある。

#### 5. I R スペクトル

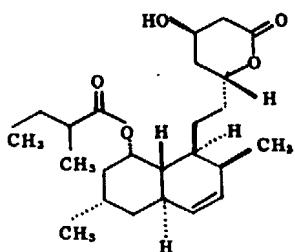
赤外線吸収スペクトルは試料を KBr 簡剤法で測定し、図 4 に示してある。

#### 6. 旋光度

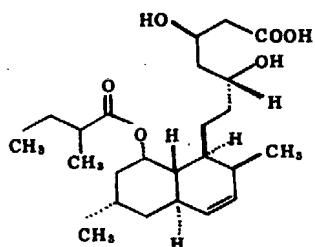
特異的な旋光度  $[\alpha]_D^{25} = 148.6^\circ$  は 5.23 ミリグラム / ミリリットル  $\text{CH}_3\text{CN}$  溶液で決定。この値はナトリウム - D - 線波長で測定して得られる。

#### 7. $^{13}\text{C}$ NMR 化学シフト ( $\text{CDCl}_3$ 中 )

11.8, 14.9, 16.5, 21.1, 23.1, 26.2 ( 2C ), 30.9, 31.3, 33.0, 35.7, 35.9, 37.4, 38.5, 38.6, 41.9 ( 2C ), 62.3, 70.1, 76.5, 131.0, 132.6, 171.2, 176.7, これらの値、及び他のデータから、本生成物の構造は次の化学式を有するで推定される。



対応するヒドロキシル酸化合物 IV は次の構造を有する。



本発明は次に記述する実施例で例示出来る。

#### 実施例 1

#### 化合物 I 及び III の製造

#### A. 培地

M F - 4833 の凍結乾燥した培養菌の入っているチューブを無菌的に開管し内容物を、250 ミリリットルの水流調節壁のない、エーレンマイヤー ( Erlenmeyer ) フラスコ ( 種 フラスコ ) 中に懸濁させる。この フラスコ中には培地 A を 20 ミリリットルを入れてある。培地 A は次の組成を有する。

#### 培地 A

トウモロコシ浸出液 ( CSL )	10 グラム
トマトペースト	80 グラム
オート麦粉	20 グラム
ケルコース	20 グラム
微量元素混合物 No. 2	20 グラム
蒸留水	1000 ミリリットル
$\text{NaOH}$ で pH 6.8 に調整。	

#### 微量元素混合物 No. 2

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1000 ミリグラム
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1000 ミリグラム
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	25 ミリグラム

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	100 ミリグラム
$\text{H}_3\text{BO}_3$	56 ミリグラム
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_24 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	19 ミリグラム
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	200 ミリグラム
蒸留、脱イオン水	1000 ミリリットル
接種した フラスコを 28 ℃ で 48 時間 220 rpm で振とう培養する ( 2 インチ回転 )。培地 B を 500 ミリリットルを含む 2 リットル エーレンマイヤー ( 水流調節壁のないもの ) フラスコ 2 本に、種 フラスコより各々 10 ミリリットルずつ成長菌を接種する。培地 B は次の組成を有する。	

#### 培地 B

トマトペースト	20 グラム
一次酵母 ( イースト )	10 グラム
C P C デンブン	20 グラム
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	5 ミリグラム
蒸留水	1000 ミリリットル
$\text{NaOH}$ で pH 7.2 - 7.4 に調整。	
これら 2 ケの接種 フラスコを 28 ℃ で 96	

時間インキュベートする。一方のフラスコは攪拌なしでインキュベートし、他は150 rpmミエーカー(2インチ回転)でインキュベートする。96時間後各フラスコの含有物を、生成物の単離のために、別にしておく。

### B 化合物Iの単離

培養液全体物を20~30分間遠心分離する。固体物を抽出のためにとつておく。上澄(pH 6~8)を950ミリリットルの容器に入れ150ミリリットルのXAD-2樹脂を加える。自動抽出機を用い、あらかじめセットしておいた予定どおりに動かして、混合物を2時間攪拌する。培養液をサイホンで除く。樹脂を200ミリリットルの脱イオン水で2回洗浄し洗浄液は捨てる。次に、混合溶媒:イソプロパノール-エチルアセテート-ジクロロメタン25-45-30を加える。混合物と2時間攪拌する。溶媒-樹脂スラリーをブフナー(Buchner)ロート又は、焼結ガラスロートで戻過し、樹脂を除去する。培地中

の固体物を100ミリリットルのアセトンで1/2時間攪拌し、混合物を遠心分離して上澄をデカントして取り、上述の戻液と合併し、15ミリリットルに濃縮する。

### C 化合物Iの検定

クラインセク(Kleinsek)、ランガサム(Rangasam)、ポーター(Poter)等によりプロナス(Proc. Nat. Acad. Sci.)74、1431-1435(1977)に報告された方法で製した酵素を用い、ベツグ(Beg)、ストニツク(Stonik)、ブルーウラー(Brewer)等によりFEBSレターズ(FEBS Letters)80、123-129(1977)に報告された方法を用いて、HMG-CoAリダクターゼ酵素の阻害物として戻液を検定する。検定の陽性(1ミリリットル中20マイクログラムで90パーセント以上の阻害作用…IC<sub>50</sub>が1ミリリットル中に2.3マイクログラムである事)はHMG-CoAリダクターゼ段階で作用する非常に有

効なステロール合成阻害物の存在を示している。

### 実施例2

#### 化合物I及びIIIの製造

##### A 酵素

###### 凍結乾燥させたアスペルギルス種

(*Aspergillus* sp.) MF-4833の培養管を無菌的に開管し、含有物を培地C40ミリリットルを含む水流調節壁のない250ミリリットル、エーレンマイヤーフラスコ(種フラスコ#1)に懸濁させる。培地Cは次の組成を有する。

##### 培地C

トウモロコシ浸出液(CSL)	5グラム
トマトペースト	40グラム
オート麦粉	10グラム
グルコース	10グラム
微量元素混合物#2	10グラム
蒸留水	1000ミリリットル
NaOHでpH 6.8にする。	

接種フラスコを28℃で24時間220 rpm振とう機(2インチ回転)でインキュベートする。培地Cを各々40ミリリットルずつ含む水流調節壁のない250ミリリットルエーレンマイヤーフラスコ(62種フラスコ)8本に、種フラスコ#1から各2ミリリットルずつ成長菌を取つて接種する。この8本の#2、種フラスコを28℃で24時間220 rpm振とう機(2インチ回転)でインキュベートする。次に、培地Bを各々500ミリリットルずつ含む水流調節壁のない2リットルエーレンマイヤーフラスコ20本に種フラスコ#2、8本中より各々14ミリリットルずつ接種する。20本のフラスコを28℃で11日間攪拌せずに培養する。11日後、20本のフラスコの含有物を取る。

##### B 抽出

全培養物を(pH 6.0)ワーリングブレンダー中に入れて、混合し、菌体のかたまりを粉

碎する。これを遠心分離し、上澄デカントする。沪過後 10 リットルの沪液を 3 リットルのエチルアセテートで抽出する。1820 ミリリットルの透明な抽出液を得る。3 リットルのエチルアセテートでもう一度抽出し、3350 ミリリットルの透明な抽出液を得る。培養固体物を 2 リットルのメタノールで 1 時間攪拌して抽出し、沪過して 2100 ミリリットルの沪液を得る。

抽出物の一部を乾燥し、実施例 1 (O) の方法により検定するために用い、以下の結果を得る。

抽出物		
量(ミリリットル)	全固体物(ミリグラム)	活性総単位
1820	1133	1,496,695
3350	787	314,900
2100	13.15	1,144,067

#### C ゲル沪過

実施例 2 (B) の最初の二種の抽出液より得られた全固体物を合併し、メタノール中に溶か

トル) を用い、展開液としてメタノール: 0.05 M リン酸アンモニウム、pH 2.9 (7.5 : 2.5) でクロマトグラフィーを行なう。分画をベツクマン分光光度計を用いて分析し 236 ナノメーター (nm) に吸収極大、229 nm, 245 nm にショルダーを示すものを合併して減圧濃縮し、水溶液とする。このものの pH を 2 M 水酸化カリウムで 6.5 に調節し、活性化合物をエチルアセテートで抽出する。有機溶媒層を乾燥し濃縮する。残サを 0.3 ミリリットルのメタノールに溶かし、上述の如くクロマトグラフィーを行なう。初めに溶出する活性化合物を含んだ分画を合併し、濃縮して水溶液とし、これをクロロホルムで抽出する。クロロホルムを留去し残サをメタノールに溶かし、留案下、溶媒留去すると、3.5 ミリグラムの乾燥生成物を得る。このものはヒドロキシ酸 (化合物 III) であると同定。第二の化合物を含む溶出分画を合併し、上述の如くクロロホルムで抽出し、0.87 グラムの

す。沪過して不溶の固体物を除去する。沪液 30 ミリリットルをセファデックス LH-20 をつめたゲル沪過カラム (2.5 センチメートル × 200 センチメートル、980 ミリリットル) に適応し、メタノールを溶媒として用い、分子の大きさに従い、分画する。屈折率及び UV を用いて検出し、最良の分画を生物検定により決定する。

全固体物(ミリグラム)	活性の全単位
分画 1 - 89	106,271
分画 2 - 278	1,099,680
分画 3 - 779	210,357

#### D 分離及び精製

上述の分画 2 をウォータース、ボンダパック C18 / ポラシル B (Waters Bondapak C18 / Porasil B) 1 グラム中を 5 倍量のメタノールを用い、あらかじめ通過させて沪過する。メタノール溶出液を 0.5 ミリリットルに濃縮する。これを、ウォータース μC18 カラム (3.9 ミリメートル × 30 センチメー

乾燥生成物を得、ラクトン (化合物 I) と同定。

#### 実施例 3

#### 化合物 I 及び III を製するための MF-4833 の最良の醸酵方法

##### アスペルギルス種 (Aspergillus sp.)

MF-4833 の凍結乾燥した培養管を無菌的に開管し、含有物を、40 ミリリットルの培地 C を含む、250 ミリリットルの水流調節壁のないエーレンマイヤーフラスコ中に懸濁させる。(種フラスコ)。接種したフラスコを 28°C で 48 時間、220 rpm シエーカー (2 インチ回転) でインキュベートする。各々 40 ミリリットルの培地 D を含む 250 ミリリットルの水流調節壁のないエーレンマイヤーフラスコ 2 本中に、上述の種フラスコから成長菌を取り、2 ミリリットルずつ接種する。培地 D は次の組成を有する。

##### 培地 D

乳糖 20 グラム

ディスティラーズ ソラブル (distiller's solubles)	15グラム
自己分解したイースト	5グラム
蒸留水	1000ミリリットル

NaOHでpH 7.0に調節する。

これらの2本の接種フラスコを28℃で96時間、150 rpmシエーカー(2インチ回転)でインキュベートする。96時間培養後、実施例2(B)の方法に従い含有物を抽出する。2本のフラスコ中の全生成物は1450～2000単位/ミリリットルである。

#### 実施例4

##### 化合物I及びIIIの製造

アスペルギルス(*Aspergillus*)種(sp.)、MF4845の凍結乾燥した培養管を無菌的に開管し、含有物を、40ミリリットルの培地Cを含む水流調節壁のない250ミリリットルのエーレンマイヤーフラスコ(種フラスコNo.1)中に懸濁させる。接種フラスコを28℃で24～48時間220 rpmシエーカー(2インチ回転)でインキュベートする。

フラスコ(種フラスコNo.3)6本に、上述種フラスコNo.2からの成長菌を各々2ミリリットルずつ接種する。6本の接種フラスコを28℃で48時間220 rpmシエーカー(2インチ回転)でインキュベートする。500ミリリットルの培地Fを含む水流調節壁のない2リットルエーレンマイヤーフラスコ6本に、上述種フラスコNo.3中の含有物を接種する。培地下は次の組成を有する。

##### 培地F

トウモロコシ浸出液(CSL)	15グラム
CPCデンブン	20グラム
トウモロコシ粉	1グラム
大豆粉	4グラム
グルコース	5グラム
大豆油	2.5グラム
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4グラム
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.3グラム
$\text{CaCO}_3$	6グラム
蒸留水	1000ミリリットル

本フラスコの一部内容物(約0.5ミリリットル)を培地Eを含むスラント管に接種する。培地Eは次の組成を有する。

##### 培地E

イーストエキストラクト	4グラム
モルトエキストラクト	10グラム
デキストロース	4グラム
寒天粉末	20グラム
蒸留水	1000ミリリットル

NaOHでpH 7.0に調節する。

接種スラントを室温で11日間インキュベートする。これを3～4ヶ月-60℃で保存する。次に、スラント中の含有菌の1部を40ミリリットルの培地Cを含む水流調節壁のない250ミリリットルのエーレンマイヤーフラスコ(種フラスコNo.2)中に懸濁させ28℃で24時間220 rpmシエーカー(2インチ回転)を用いてインキュベートする。次に培地Cを40ミリリットル含む、水流調節壁のない250ミリリットルエーレンマイヤー

NaOHでpH 6.7に調節する。

接種フラスコを28℃で攪拌せず11日間インキュベートする。11日後、実施例2(B)の方法で抽出する。フラスコ中の全生成物を1231単位/ミリリットルである。

#### 実施例5

##### 化合物I及びIIIを生成するためのMF-4845による最良の醸酵方法

アスペルギルス種(*Aspergillus* sp.)MF-4845の凍結乾燥した培養管を無菌的に開管し、含有物を40ミリリットルの培地Cを含む水流調節壁のない250ミリリットルのエーレンマイヤーフラスコ(種フラスコ)中に懸濁させる。これを28℃で30時間220 rpmシエーカー(2インチ回転)にてインキュベートする。培地Gを40ミリリットル含む水流調節壁のない250ミリリットルエーレンマイヤーフラスコ中に上述の種フラスコから成長菌を2ミリリットル接種する。培地Gは次の組成を有する。

培地 G

デキストロース	45グラム
ペプトン化ミルク	24グラム
自己分解イースト	2.5グラム
ポリグリコールP 2000	2.5ミリリットル
蒸留水	1000ミリリットル

NaOHでpH 7.0に調節する。

接種フラスコを28℃で120時間220 rpmシエーカー(2インチ回転)を用いてインキュベートする。120時間培養した後、実施例2(B)の方法に従い、フラスコの内容物を抽出する。フラスコ中の全生成物は21,500単位/ミリリットルである。

実施例 6A 化合物I及びIIIを製するためのMF-4833による大量培養

醸酵工程に用いる培地は以下の組成を有する。

トウモロコシ浸出液(GSL)	5グラム
トマトペースト	40グラム

rpmでロータリーシエーカーにて振とうする。次に、培地40ミリリットルを含む、フラスコ中に、上述の培養したフラスコ中の成長菌を1ミリリットル入れ、28℃で24時間振とう培養する。400ミリリットルの培地を含有する2リットルフラスコに第二段階の培養菌を10ミリリットル入れ、28℃で24時間振とうする。

200ガロンのステンレス製培養タンク中に、50リットルの以下に記す培地を入れる。

乳糖	2パーセント重量/容量
ディスティラーズソラブル (distillers soluble)	1.5パーセント重量/容量
自己分解したイースト	0.5パーセント重量/容量
ポリグリコールP 2000	0.25パーセント重量/容量

pHを7.0に調節する。これを121℃で15分間殺菌する。上述の第三工程の培養物を1リットル入れ、28℃で96時間10 cmの空気流量で、130 rpmにてインキュベート

オート安粉	10グラム
グルコース	10グラム
微量元素溶液	10ミリリットル
蒸留水	1000ミリリットル
NaOHでpH 6.8に調節する。	

微量元素溶液は次の組成を有する。

FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1グラム
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1グラム
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	25ミリグラム
CaCl <sub>2</sub>	100ミリグラム
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	56ミリグラム
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O	19ミリグラム
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	200ミリグラム
蒸留水	1リットル

全て、培地は、微生物を接種する前に無菌性をチェックする。

250ミリリットルの水流調節壁のないエレンマイヤーフラスコに40ミリリットルの培地を入れ、凍結乾燥した微生物MF-4833を接種する。28℃で24時間220

する。

B 化合物Iの単離

上述のMF-4833の培養全体物110ガロン中に、約37.5ポンド(2.5kg)( $\frac{3}{4}$ 袋)の珪藻の沪過用物質を加え、混合物を18インチフィルターブレスを通じて沪過する。澄明沪液(pH 6.6)に450ミリリットルの濃塩酸を注意深く加えてpH 4.0にし、3分の1量の(36ガロン)のエチルアセテートで攪拌下抽出する。分離後、上層を取り、水層を再びエチルアセテート(38ガロン)で同様に抽出する。分離後、2つの抽出物を合併し、12ガロンの水で洗浄する。エチルアセテートを30℃以下で減圧濃縮し、1ガロンよりやゝ少な目にする。

上述抽出より得た約1ガロン(3800ミリリットル)のエチルアセテートをさらにロータリーエバボレーターで濃縮(約10ミリメーター、40℃温浴)してシロツプとする。次に1リットルのメチレンクロライドを加え

た後、2回機締し、極性溶媒のシロップを遊離させる。250グラムの乾燥重量固体物を含む300ミリリットル油状物を750ミリリットルのエチルアセテート：メチレンクロライド混合液(30/70；v/v)に溶かし、200グラムのシリカゲルを加えてスラリーにする。2.5キログラムの同じシリカゲルを充てんした、14センチメートル×36センチメートルカラム(7.5リットル容量)の上端部に層にして入れる。(このカラム中には同一の溶媒混合物でシリカゲルがスラリーで充てんされている。)同一の溶媒で展開させ、流出溶媒3リットルを前溶出物として取り去るまで展開させる。

エチルアセテート-メチレンクロライド(50/50；v/v)で800ミリリットルずつ取りながら展開し12分画を取る。次に100パーセントエチルアセテートで展開し、7分画取り、さらに、100パーセントアセトンで溶出させる。実施例1で言及した、

HMG-CoAリダクターゼ阻害における生物活性を分画2～分画24について検定する。分画7～分画11中に活性が認められた。最高活性は分画8に見られた。これをさらに精製するために濃縮して油状物とする。乾燥重量9.0グラム。

分画8を50ミリリットルのメチレンクロライド中に入れ粉碎する。これを済過すると済過物は4.9グラムである。2-インチ内径、1メートルの長さのカラムに、メチレンクロライドで膨脹させ平衡させたセファデックスLEH-20デキストランゲル(ファルマシア社製)を充てんしたものに上述の済液をのせる。カラムをメチレンクロライドで1.5ミリリットル/分の速度でクロマトグラフを行なう。化合物Iは0.64～0.81カラム容量で溶出する。溶媒を留去すると、0.290グラムのわずかに茶色の残サを得る。この残サ(213ミリグラム)を1.5ミリリットルのCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>CN(65-35)に溶かす。あ

らかじめ充てんされ平衡化されたシリカゲルカラム(FMロウバー(LOBAR)サイズB)に、この溶液を乗せ5ミリリットル/分でCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>CN(65-35)で溶出する。235～360ミリリットルの溶出分画の溶媒を留去すると121ミリグラムの結晶性物質が得られる。融点155-160℃0.05M、リン酸ナトリウムpH3.0-アセトニトリル(45-55)混合物を溶出液とし、2ミリリットル/分の速度で、EMRP18逆相分析カラム(E.メルク社、HIBARI、カタログ#906046)に本結晶物質を適応してHPLCを行なうと、11分に特性UV吸収ピークを示す。

82ミリグラムの本物質を0.6ミリリットルの無水エタノールで再結晶し、さらに0.4ミリリットルの無水エタノールで再結晶してからP<sub>2</sub>O<sub>5</sub>を入れたデシケーター中で一夜乾燥すると40ミリグラムの白色羽状結晶を得る。上述の分析用HPLCによれば溶出時間

11分に、单一のピークを示す。さらに再結晶後融点170-171℃

生成物はスペクトル等により化合物Iと同定。in vitroにおいて、本物品はHMG-CoAリダクターゼ検定(実施例1における)では、IC<sub>50</sub>が0.01マイクログラム/ミリリットルである。

#### 実施例7

##### 化合物IIIのアンモニウム塩の直接単離

実施例20Aにおける培養液(100ガロン)をH<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>でpH5にする。エチルアセテート(70ガロン)を加え、混合物をはげしく搅拌する。次に済過して菌体を除き、菌体をさらに少量のエチルアセテートで洗浄して、上述抽出液と合併する。有機溶媒層を分離し0.2N水酸化ナトリウム溶液5ガロンを加え、混合物をはげしく搅拌し、次に放置する。水層を分離し、pH9をH<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>にて、5に調節する。次に最初2ガロンのヘキサン-エチルアセテート2:1混合液で抽出し、次に1ガロ

ンの同じ溶媒混合物で抽出する。有機溶媒を合併し、 $\text{HgSO}_4$ で乾燥する。次に乾燥剤を沪過して除き、沪過物を1リットルの同じヘキサン-エチルアセテート溶液で洗浄する。洗浄液を上述沪液と合併し、2リットルのアセトンで希釈した後、アンモニアガスを導入しながら攪拌する。ガスが吸收され結晶性沈殿が出来る。アンモニアが吸收されなくなると、溶液の色は暗く変り、アンモニア導入を中止する。溶液を沪過した後、数時間放置する。粗アンモニウム塩をアセトンで洗浄し無色結晶とした後空気乾燥する。

粗アンモニウム塩をクロロホルム-メタノール-濃アンモニア水(80:20:2)混合液、1.5ガロンで再結晶する。不溶性の色のついた物質を沪過し、沪液を当量のアセトン-エーテル1:1溶液と希釈する。黄かつ色のアンモニウム塩の結晶を沪過して得る。(96.5グラム)

さらに精製するには、上述化合物70グラムを

2リットルの熱イソプロパノール-濃アンモニア水(95:5)で再結晶する。10グラム活性炭を加え、熱時沪過する。沪液を室温にまで冷却し-20°Cで一夜放置する。固体物を沪過し冷イソプロパノール(-20°C)で洗浄し、次に冷アセトンで洗浄してから室温でエーテルにて洗浄する。生成物を窒素ガス下乾燥し60グラムのアンモニウム塩の白色結晶を得る。

#### 実施例8

##### 化合物Ⅲの塩

実施例6の生成物40ミリグラムを2ミリリットルのエタノールに溶かし、これに1ミリリットルの $\text{NaOH}$ 水溶液(10⁻⁴モル、1当量)を加える。室温で1時間後混合物を減圧留去して、化合物Ⅲのナトリウム塩を得る。

同様にして1当量の水酸化カリウムを用い、カリウム塩を製する。

#### 実施例9

化合物Ⅲのレーエリシン塩を得る。

##### 実施例11

##### 化合物Ⅲのレーオルニチン塩

実施例9で述べた方法に従い、132ミリグラムのレーオルニチン遊離塩基と化合物Ⅲのアンモニウム塩440ミリグラム溶液を混合し溶媒を減圧下留去し、残サを熱エタノール中で粉碎した後冷却し沪過して乾燥すると化合物Ⅲのレーオルニチン塩を得る。

#### 実施例12

##### 化合物ⅢのN-メチルグルカミン塩

実施例9で述べた方法に従い、1.5ミリリットルの水に195ミリグラムのN-メチルグルカミンを溶かした溶液を、化合物Ⅲのアンモニウム塩440ミリグラムの11.5ミリリットル85パーセントエタノール溶液を混合する。溶媒を減圧下濃縮し、化合物ⅢのN-メチルグルカミン塩を得る。

#### 実施例13

##### 化合物Ⅲのエチレンジアミン塩

##### 化合物Ⅲのレーエリシン塩

146ミリグラムのレーエリシンの、1.5ミリリットル65パーセントエタノール溶液を、440ミリグラムの化合物Ⅲのアンモニウム塩による11.5ミリリットル85パーセントエタノール溶液に加える。溶媒を減圧下濃縮し、残サを10ミリリットルの熱エタノール中で粉碎する。これを冷却し沪過して化合物Ⅲのレーエリシン塩を430ミリグラム得る。融点178°-180°C(分解)

元素分析  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$  として

計算値 C, 63.65; H, 9.22; N, 4.93

実測値 C, 62.80; H, 9.13; N, 4.83

#### 実施例10

##### 化合物Ⅲのレーエルギニン塩

実施例9で述べた方法に従い、174ミリグラムのレーエルギニン塩基と化合物Ⅲのアンモニウム塩440ミリグラム溶液を混合し、溶媒を減圧下留去し残サを熱エタノール中で粉碎した後冷却し沪過して乾燥すると化合物

1.8グラムの化合物Iを1.80ミリリットルの熱イソプロパノールに溶かし、0.5MのNaOH水溶液9.0ミリリットルと混合する。1時間反応させた後、1.80ミリリットルの水で希釈し、減圧下濃縮して、イソプロパノールを除去し、冰浴中で冷却する。これに9.0ミリリットルの0.5M HClをゆっくり加え、混合物を2×1.50ミリリットルのエチルアセテートで抽出する。エチルアセテート層を1.00ミリリットルの水で洗浄し、MgSO<sub>4</sub>にて乾燥する。溶媒を低温で減圧下留去する。残サを1.50ミリリットルのエタノールに溶かしこれに3ミリリットルのエチレンジアミンを加える。溶媒を減圧下留去し、残サを、熱エチルアセテートで粉碎する。冷却後汎過し、3.0ミリリットルのイソプロパノールで再結晶しP<sub>2</sub>O<sub>5</sub>上にて減圧乾燥すると、1.31グラム白色結晶を得る。融点152-153.5℃

元素分析 (C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>O<sub>6</sub>)<sub>2</sub><sup>-</sup> · (C<sub>2</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>)<sup>++</sup>

アンモニウムヒドロキサイドと反応せしめる。生成物がエーテルにより一部結晶として、沈殿する。これを遠心分離し沈殿物をエーテルで洗浄し、1ミリリットルのイソプロパノールに5ミリリットルのエーテル、5ミリリットルの低沸点石油エーテルを加えて、再結晶すると6面体結晶を得る。2.7ミリグラムを得る。65パーセント収率。

#### 化合物IIIのテトラメチルアンモニウム塩の<sup>1</sup>H NMRスペクトル

(6ミリグラム/0.35ミリリットル  
CDCl<sub>3</sub>、25℃にて300メガヘルツ)

0.83 t (3H, J = 6.5 Hz)  
0.84 d (3H, J = 7.0 Hz)  
1.02 d (3H, J = 7.0 Hz)  
1.05 d (3H, J = 7.0 Hz)  
1.24 m (~1H); (1.30~1.80 (br. m.))  
1.88 d d d (1H, J = 2, 8, 15 Hz)  
1.98 d d (1H, J = 3, 15 Hz)  
2.16 d d (1H, J = 8.5, 15.5 Hz)

として

計算値 C, 66.35; H, 9.35; N, 3.09

実測値 C, 66.08; H, 9.49; N, 3.01

#### 実施例1-4

##### 化合物IIIのカルシウム塩

化合物IIIのアンモニウム塩8.7.9ミリグラムを3ミリリットルの水に溶かし加熱攪拌する。7.4ミリグラムの分析用Ca(OH)<sub>2</sub>を加え、混合物をアンモニアガスが発生しなくなるまで加熱攪拌する。わずかに褐色が残るが、これを遠心分離して除く。無色上澄を凍結乾燥し、乾燥物質を種々の溶媒あるいはそれらの混合物で再結晶するのに用いる。乾燥インプロパノール中加熱して溶かし、これを濃縮して室温にて冷却すると針状晶を得る。

#### 実施例1-5

##### 化合物IIIのテトラメチルアンモニウム塩

1ミリリットルのCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>に溶かした3.4ミリグラムの化合物Iをメタノール中0.04ミリリットルの24パーセントテトラメチル-

2.23 m (1H, 不規則)  
2.32 m (1H, 不規則)  
2.37 d d (1H, J = 3, 15.5 Hz)  
2.40 m (~1H, 不規則)  
3.42 s (12H, MeN<sup>+</sup>)  
3.79 m (1H, 対称マルティプレット)  
4.06 m (1H, 対称マルティPLETT)  
5.32 d t (1H, J ≈ 3 Hz)  
5.50 br. s (1H)

5.79 d d (1H, J = 6, 10 Hz)  
5.98 d (1H, J = 10 Hz)

化学シフトは内部標準TMSからの低磁場ppmで示してある。

カッコ内の結合定数はヘルツである。

s = シングレット、d = ダブレット、t = トリプレット、m = マルティPLETT。

#### 実施例1-6

##### 化合物IIIのアンモニウム塩

実施例1-3で述べた方法に従い、化合物Iをヒドロキシ酸、化合物IIIに変換し、エチル

アセテートで抽出し、 $\text{MgSO}_4$ で乾燥してから、これを戻過し、無水アンモニアと、攪拌下、反応させ、冷却してアンモニウム塩の沈殿を得る。

#### 実施例 17

##### ヒドロキシ酸、化合物Ⅲの製造

実施例 7 で製したナトリウム塩を 2 ミリリットルのエタノール-水 (1:1) に溶かし 1.0 ミリリットルの 0.1 N 塩酸を加え遊離のヒドロキシ酸をエチルアセテートで抽出する。エチルアセテートを水洗し乾燥して 30°C 以下で減圧留去する。ヒドロキシ酸は放置するとゆづくりとラクトンにもどる。

#### 実施例 18

##### 化合物Ⅲ

化合物Ⅲのエチレンジエミン塩 4.53 ミリグラムを 8.0 パーセントエタノール 6 ミリリットルに溶かす。冰浴中で冷却し、1 ミリリットルの 1 M  $\text{HCl}$  と反応せしめ、減圧下留去してエタノールを除く。さらに 3 ミリリット

ずかに変化する。

#### 実施例 19

##### 化合物Ⅲのエチルエステル

化合物Ⅰ (MSD-803) 500 ミリグラム (1.24 ミリモル) の 20 ミリリットルエタノール懸濁液を空素ガス下室温で攪拌する。金属ナトリウムの小片 (約 1 ミリグラム) を加える。15 分後さらに金属ナトリウムを加える。反応 30 分後均一反応混合物をエチルで希釈し、水洗しさらに、飽和食塩水で洗浄した後乾燥する、( $\text{MgSO}_4$ )、溶媒を留去すると、ワックス状固体を得る。ホワットマンパターシル (Whatman Partasil) 10 パックカラム (4.6 センチメートル  $\times$  25 センチメートル) を用い 10 パーセントイソプロパノール/ヘキサンを溶媒とし 6 ミリリットル/分により HPLC 分析によればエチルエステルと MSD-803 の混合物である事を示す。(77:23)、本混合物は、シリカゲル (230~400 メッシュ) を用い、3

特開昭57-163374(16)  
ルの水と処理して 2  $\times$  5 ミリリットルのエチルアセテートで抽出し、冰浴中冷却しながら水洗し、抽出物を  $\text{MgSO}_4$  で乾燥する。減圧下、溶媒留去するとヒドロキシ酸の無色油付物を得る。

$\text{CDCl}_3$  中における  $^{13}\text{C}$ -nmr スペクトル (190 ミリグラム/ミリリットル) は表に示すようにヒドロキシ酸残基から 6 番目の炭素までの化学シフトが存在する。放置するとヒドロキシ酸はゆづくりラクトンにもどる。

#### 表

##### $^{13}\text{C}$ -Nmr スペクトル

テトラメチルシランから 低磁場 ppm ヒドロキシ酸、化合物Ⅲ	
C <sub>1</sub>	174.8
C <sub>2</sub> , C <sub>4</sub>	42.4, 41.6
C <sub>3</sub>	68.8
C <sub>5</sub>	72.3
C <sub>6</sub>	34.9

分子の残りの炭素スペクトルは閉環によりわ

パーセントエタノール/メチレン-クロライドで溶出し、圧力クロマトグラフィーにより分離する。エステルを含む分画を合併し、留去すると 35.8 ミリグラム (6.6 パーセント) の無色固体を得る。融点、67°C。

本物質の 1 部をヘキサンで再結晶すると白色針状晶を得る。融点 66.5~68.5°C

元素分析  $\text{C}_{20}\text{H}_{42}\text{O}_6$  として

計算値 C, 69.30; H, 9.40

実測値 C, 69.22; H, 9.58

同様にして、当量のメタノール、プロパン、ブタノール、イソブタノール、 $\alpha$ -ブタノール、アミルアルコール、イソアミルアルコール、2-ジメチルアミノエタノール、ベンジルアルコール、フェニタノール、2-アセトアミドエタノール、等を用いると、対応するエステルが得られる。

#### 実施例 20

##### 化合物Ⅱ及びⅣの製造

##### A 脱離

凍結乾燥した培養菌 M F - 4 8 . 4 5 のチューブを無菌的に開管し、含有物を 1 0 ミリリットルの培地を含む水流調節壁のない 2 5 0 ミリリットルのエーレンマイヤーフラスコに入れる。(種フラスコ) 培地は次の組成を有する。

#### 培地

トウモロコシ浸出液 (CSL)	5グラム
トマトペースト	40グラム
オート麦粉	10グラム
グルコース	10グラム
微量元素溶液	10グラム
蒸留水	1000ミリリットル

NaOH で pH 6.8 に調節する。

#### 微量元素溶液

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1000ミリグラム
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	1000ミリグラム
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	25ミリグラム
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	100ミリグラム
$H_3BO_3$	56ミリグラム

にて 12 時間、 130 rpm で 84 時間、空気を導入しながら (5 cfm で 12 時間、 10 cfm で 84 時間) インキュベートする。

#### B 単離

##### 1. 抽出

100ガロンの全培養物二基分を合併し、800ミリリットルの濃塩酸を注意深く加えて pH 4.1 とする。これに 75ガロンのエチルアセテートを加えて 2 時間攪拌して抽出する。

25ポンドの珪そう土を加え、全スラリーを 24 インチのフィルタープレスを用いて、圧縮汎過する。汎過した固体物にさらに、75ガロンのエチルアセテートで洗浄する。この操作を 4 回くり返す。全洗浄溶媒を最初の汎液と合併する。二層の汎液を放置し、水層を除く。エチルアセテートを 10ガロンの脱イオン水で洗浄し、各層を分離し、エチルアセテートを減圧下、濃縮して約 10ガロンにする。

##### 2 ラクトン化

$(NH_4)_6Mo_7O_24 \cdot 4H_2O$  19ミリグラム

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  200ミリグラム

蒸留脱イオン水 1000ミリリットル

接種したフラスコを 28°C で 24 時間 220 rpm シエーカー (2 インチ回転) にてインキュベートする。500ミリリットルの培地を含む水流調節壁のない 2 リットルのエーレンマイヤーフラスコに、第 1 段階の成長菌を 10ミリリットル接種する。これを再び 28°C で 24 時間振とうする。

200ガロンのステンレススチール製タンクに、485リットルの以下に示す培地を入れる。

セレロース 4.5パーセント重量/容量

ペプトン化乳 2.5パーセント重量/容量

自己分解イースト 0.25パーセント重量/容量

ポリグリコール P 2000 0.25パーセント重量/容量

この pH を 7.0 に調節する。これを 121°C で 15 分間殺菌する。上述の第二段階培養菌を 1 リットル接種する。混合物を 28°C で 85 rpm

(抽出物中の化合物 IV を化合物 II にラクトン化するため以下に示す共沸処理を行なう。)

さらに 300ガロンの全培養物のエチルアセテート抽出物を上述抽出物と合併する。これを真空蒸留により 30ガロンにする。これに 50ガロンのトルエンを加え、32ガロンにまで減圧濃縮する。この操作をくり返した後、新しいトルエンを加えて 75ガロンにする。このものを 2 時間、106°C 以上で置流し、溶液を減圧下濃縮して少量にし、さらに大型ロータリーエバボレーターで減圧濃縮する。

##### 3. シリカゲルによるクロマトグラフィー

上で得た抽出物にメチレンクロライドを 2ガロン加え、他の溶媒を除くため、フラッシュ留去して油状物とする。

油状物を 5ガロンのエチルアセテート-メチレンクロライド (30/70; v/v) 混合物に溶かす。これに 2.8キログラムのシリカゲルを加えてスラリーとし 12 インチ ×

50インチのシリカゲルカラムに同じ溶媒を入れ、この上部にスラリーを置く。

エチルアセテート-メチレンクロライド(40/60; v/v)で800ミリリットル/分の速度で展開する。初めに10ガロン、続いて4ガロンずつ分取する。

分画6-10を減圧下濃縮して油状残サとし、これを熱エチルアセテートに溶かし脱色炭で処理する。これを熱時沪過し冷却する。MSD803(化合物I)を沪取し、母液を濃縮して、さらにクロマトグラフィーを行なう。

#### 4. シリカゲルによる再クロマトグラフィー

さらに600ガロンの培養物から抽出された抽出物より得られる上述の母液残サを、メチレン-クロライド中上述母液残サと合併する。この溶液の半分でシリカゲルクロマトグラフィーを行なう。この溶液の1部を取り、換算すると、含有している全固体物の量は325グラムである。溶液を40グラムの脱

色炭で処理し、沪過する。沪過した固体物をメチレンクロライドで洗浄して沪過し、両沪液を合併し、水洗してから減圧濃縮すると油状残サを得る。これを再び、800ミリリットルのエチルアセテート-メチレンクロライド(30/30; v/v)に溶かし、225グラムのシリカゲルでスラリーにする。同じ溶媒で充てんした14×36センチメートルのシリカゲルカラムの上部に、このスラリーを置く。エチルアセテート-メチレンクロライド(40/40; v/v)で展開する。初め3リットルを取り続いて800ミリリットルずつ分取する。

#### 5. 逆相クロマトグラフィー

上述クロマトグラフィーの分画12の40ミリリットルを濃縮して500ミリグラムの油状物を得る。これを5ミリリットルアセトニトリル中に溶かし、プレバラティップ液体クロマトグラフィーカラム用充てん物<sup>4</sup>、ボンダパック C-18/ボラシル B (Bondapak

C-18/ Porasil B )<sup>5</sup> (ウォータース社、ミルフォード、マサチューセッツ州、01757) (Waters Associates, Inc., Milford, Mass. 01757) で充てんした外径 $\frac{5}{8}$ インチ、長さ6フィートのステンレススチール製カラムに適応する。カラムは55パーセントアセトニトリル45パーセント0.05MアンモニウムホスフェートpH3(v/v)の混合物で展開する。1360ミリリットル~1700ミリリットルの溶出液を合併する。これは屈折率計を検出を用いて行なう。有機溶媒を減圧下留去し残つた水溶液をエチルアセテートで抽出する。エチルアセテートを減圧下留去すると、120ミリグラムの表記化合物を得る。ニトリルから結晶化し、結晶MSD883(化合物II)を得る。融点129~131℃。

#### 実施例21

##### 化合物II及びIVの単離変法

実施例7で述べたようにして1100ガロ

ンの培養から単離した粗アンモニウム塩を(20-B-2)で述べたように水に溶かし、濃塩酸でpH3にしてからトルエンで抽出し、2時間還流する事によつてラクトン化する。減圧濃縮して少量とし、化合物Iを少量の化合物IIとの混合物とともに得る。これを沪過して乾燥する。

12基の培養タンクより得られた上述の物質を合併し、101ポンンドのエタノールで再結晶し、沪過して、さらにエタノールで洗浄する。洗浄液を合併し、上述の沪過母液と合併し、減圧濃縮して3ガロンとする。析出する化合物Iを沪過する。沪過母液を以下のように処理する。

母液を減圧濃縮してエタノールを除き、アセトニトリルを加え、沪過して不溶物を除く。100ミリリットルのアセトニトリル溶液を、あらかじめ1リットルのアセトニトリルで洗浄した逆相C-18充てん物200ミリリットル中を通過させる。合併した沪液を濃縮し

全量 360 ミリリットルのクロマトグラフ用溶媒 (60 アセトニトリル - 40 水、 v/v) に溶かし、微量の不溶物を除く。1部を取つて留去した後の固体物から換算すると全固体は 15.3 グラム含有する。

上述溶液 160 ミリリットルをウォータース、 Prep 500 システムで、 C-18 逆相充てん物 (ウォータース社、シリカゲルにオクタデシルをコーティングしたもの) をつめた、カートリッジカラム 5 × 30 センチメートルを 2 本用いてクロマトグラフィーを行なう。溶媒として、アセトニトリル - 水、 60-40 (v/v) を用い、室温で、 130 ミリリットル/分流速度にて屈折計を検出器に用いて行なう。最初の 3900 ミリリットルは不純物が含有し、これを除き、化合物 I のピークは 3900~5850 ミリリットルの間で得られる。5850~6500 ミリリットルの分画を合併し、再クロマトグラフィー用にとつておく。最後のピークが純化合物 II に相当する。

して化合物 IV のアンモニウム塩を得る。重量 0.72 グラム。

#### 実施例 2-2

##### 化合物 IV の塩

実施例 2-0 の生成物 40 ミリグラムの 2 ミリリットルエタノール溶液に、 1 ミリリットルの NaOH 水溶液 (10~ モル : 1 当量) を加える。室温で 1 時間後、混合物を減圧下乾固し、化合物 IV のナトリウム塩を得る。

同様にして、 1 当量の水酸化カリウムを用いてカリウム塩を得る。1/2 当量の CaO を用いるとカルシウム塩が得られる。

実施例 9~12 及び 14 で述べた方法を用い、化合物 III のアンモニウム塩の代りに当量の化合物 IV のアンモニウム塩を用い、化合物 IV のレーリシン、 L-アルギニン、 L-オルニチン、 N-メチル-グルカミン、カルシウム塩をそれぞれ得る。

実施例 13、 15、 16 で述べた方法を用い、化合物 I の代りに当量の化合物 II を用い

6500~8450 ミリリットルの分画を取り、濃縮して 3 グラムの油状物を得る。

この濃縮物の半分 (約 1.5 グラム) を取り化合物 IV のアンモニウム塩としてクロマトグラフィーを行なうために用いる。すなわち、約 1.5 グラムを熱メタノールに搅拌下溶かし、すぐに十分量の 1 N 水酸化ナトリウムを加えて、 pH を 10.5~11.0 に保つ。このためには 3.5~3.8 ミリリットルのアルカリが必要である。30 分間放置後、溶液を戻し不溶物を除く。溶液を、 1 インチ × 34 インチの 300~325 メッシュ混合 XAD-2 樹脂 (ステレン-ジビニルベンゼン共重合体) カラム中を 23 パーセントアセトニトリル-77 パーセント 0.1 N 水酸化アンモニウム混合液で、 2 ミリリットル/分の速度にて、 40 °C で圧力下、クロマトグラフィーを行なう。20 ミリリットルずつ分画には不純物及び化合物 III の塩、を含む。分画 45~61 を取り減圧濃縮する。残サの水溶液を凍結乾燥

ると、それぞれ化合物 IV のエチレンジアミン、テトラメチルアンモニウム、及びアンモニウム塩を得る。

#### 実施例 2-3

##### ヒドロキシ酸、化合物 IV の製造

実施例 2-2 で製したナトリウム塩を 2 ミリリットルのエタノール - 水 (1:1) 混合液に溶かし 10 ミリリットルの 0.1 N 塩酸中に加える。遊離のヒドロキシ酸をエチルアセテートで抽出する。エチルアセテートを水洗し、乾燥して 30 °C 以下の浴温で減圧留去する。出来たヒドロキシ酸は放置するとゆつくりとラクトンにもどる。

#### 実施例 2-4

##### ヒドロキシ酸、化合物 IV の製造

221 ミリグラムの化合物 IV のアンモニウム塩を 4.5 ミリリットルの 65 パーセントエタノールに溶かす。氷で冷却し 0.5 ミリリットルの 1 M HCl を加えて pH 3 にする。これを低温にてロータリーエバボレーターで濃縮し

約2ミリリットルにする。これに2ミリリットルの水を加え、2×3ミリリットルのエチルアセテートで抽出する。これを1ミリリットルの水で洗浄し、溶液を水浴中で冷却する。抽出物を $\text{MgSO}_4$ で乾燥し、溶液を減圧留去すると無色油状物のヒドロキシ酸を得る。

$\text{CDCl}_3$ 中の $^{13}\text{C}$ -nmrスペクトルは分子中のヒドロキシ酸の最初の6番目までの炭素の化学シフトが次表に示すとおりである。放置すると、このヒドロキシ酸はゆつくりとラクトンにもどる。

表

$\text{CDCl}_3$ 中の $^{13}\text{C}$ -nmrスペクトル。テトラメチルシランより低磁場 ppm

ヒドロキシ酸、化合物IV	
C <sub>1</sub>	175.0
C <sub>2</sub> , C <sub>4</sub>	42.2, 41.7
C <sub>3</sub>	68.8
C <sub>5</sub>	72.5
C <sub>6</sub>	35.0

本発明の新規化合物の如き、効力ある阻害物を用い、単に阻害物-基質混合物に酵素を加える基本法では直線的な、反応速度論が得られない。

この変法を用い、化合物IVのナトリウム塩はHMG-CoAリダクターゼを阻害するIC<sub>50</sub>は $2.7 \times 10^{-9}\text{M}$ であり、ちなみにML-236Bでは $5.4 \times 10^{-9}\text{M}$ である。

#### B $\text{in vitro}$ でのコレステロール合成阻害(化合物II)

ホルツマン(Holtzman)オスラットに生理食塩水中の5パーセントエマルホワー(Emulphor)又はエマルホワ(Emulphor)中の検定化合物を胃管内に投与する。1時間後、80マイクロキューリーの $^{14}\text{C}$ アセテート/キログラムを腹腔内(IP)注射する。50分後、ラットを殺し、 $^{14}\text{C}$ コレステロールをステロール合成の尺度として決定する。

投与、ミリグラム/キログラム パーセント阻害

0.15

分子中の残りの炭素のスペクトルにおいて、閉環すると、わずかに化学シフトが変化する。

#### 実施例25

#### 化合物IVのエチルエステル

実施例19で述べた方法に従い、そこで用いた1.24ミリモルの化合物Iの代りに当量の実施例20で得た化合物IIを用い、化合物Vのエチルエステルを得る。

同様にしてメチル、プロピル、ブチル、イソブチル、*t*-ブチル、アミル、イソアミル、2-ジメチルアミノエチル、ベンジル、フェネチル、2-アセトアミドエチル、等のエステルを得る。

#### 実施例26

#### A HMG補酵素Aリダクターゼの $\text{in vitro}$

##### における阻害

ベツグ(Beg)等の方法(FEBS Letters、FEBS Letters、80、123(1977))をわずかに変え、基質との反応を始める前に、5分間酵素を阻害物とインキュベートする。

0.6	51
1.2	70

#### 実施例27

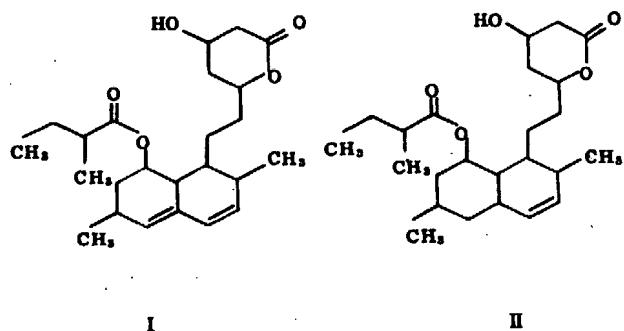
#### 培養細胞中のステロール合成阻害物としてのI、II、及びML-236Bの比較

マウスL-M細胞中での $^{14}\text{C}$ 酢酸から $^{14}\text{C}$ -ステロール合成の程度を測定するA.W.アルバート(A.W. Alberts)等の方法(シヤーナル・バイオロジカルケミストリー(J. Biol. Chem.)249、5241(1974))を改良して行なう。10マイクロリットルのDMSO中の検定化合物を5マイクロキユーリーの $^{14}\text{C}$ アセテートと共に单層培養細胞中に加える。細胞をケン化し、 $^{14}\text{C}$ -ステロールを抽出しシリカゲルで石油エーテル-ジエチルエーテル-酢酸(75:25:1)を用いて薄層クロマトグラフィーで単離する。プレート上の $^{14}\text{C}$ -ステロールを含む部位は、I<sub>1</sub>で着色し、 $^{14}\text{C}$ 含量は液体シンチレーションカウンターで決定する。

改良法を用いると化合物 II は HMG-CoA リダクターゼ阻害における  $IC_{50}$  が 1.7 nM で、化合物 I では 2.2 nM、ML-236B は 4.6 nM である。

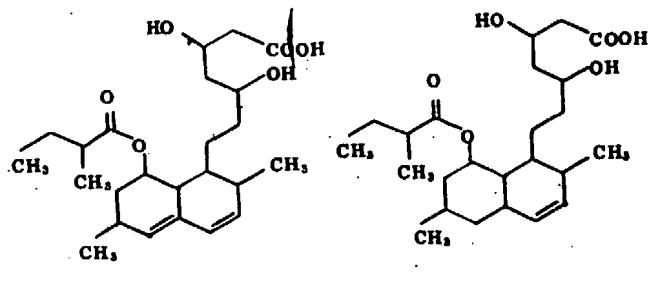
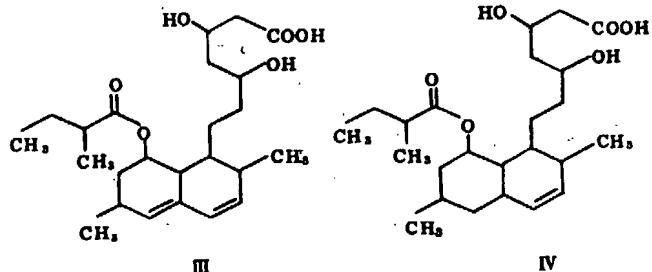
本発明の技術的実施範囲は次の通りである。

1. アスペルギルス・テレウス (Aspergillus terreus) 属の微生物と栄養培地を譲譲せしめ、生成物を単離する事を特徴とする式



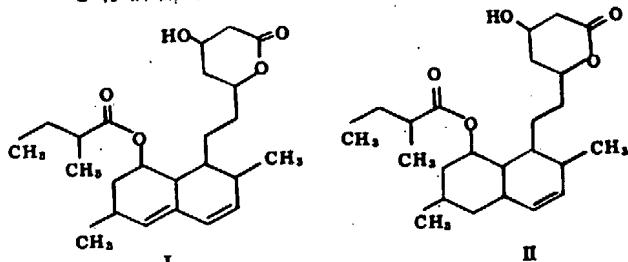
### の化合物の製法。

3. 微生物が、アメリカンタイプカルチャー  
コレクション [ A. T. C. C. ( American  
Type Culture Collection ) ] に受入番号  
第 20541 号及び第 20542 号で寄託され  
ているものである特許請求の範囲第 2 項の  
方法。
4. 单離が醸酵混合物を溶媒で抽出し、次に  
クロマトグラフィーを行う事を特徴とし  
ている特許請求の範囲第 2 項の方法。
5. アスペルギルス テレウス (Aspergillus  
terreus) 属の微生物と栄養培地を醸酵せ  
しめ、生成物を単離する事を特徴とする式:



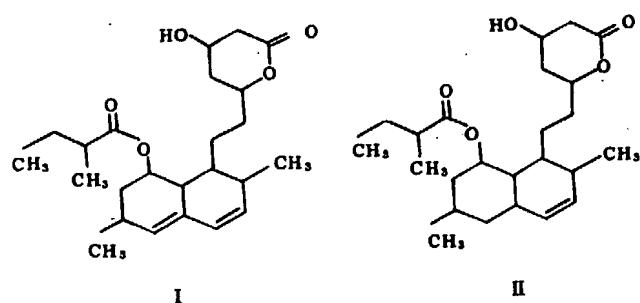
### 二化合物の製法

2 アスペルギルス テレウス (Aspergillus  
terreus) 属の微生物と栄養培地を醸酵せしめ生成物を単離せしめることを特徴とする特許請求の範囲第1項の式：



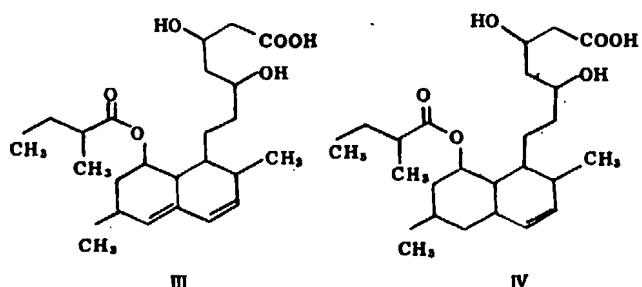
### の化合物の製法。

6. 微生物がアメリカンタイプカルチャーコレクション (American Type Culture Collection) の受入番号第 20541 号及び第 20542 号で寄託されているものである特許請求の範囲第 5 項の方法。
7. 单離が、酵酇混合物を溶媒で抽出し、次にクロマトグラフィーを行う事を特徴としている特許請求の範囲第 5 項の方法。



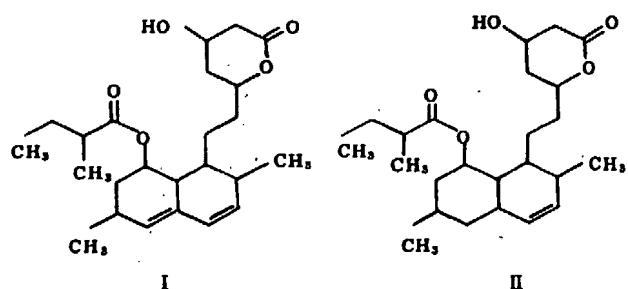
より選んだ化合物。

## 9. 式 :



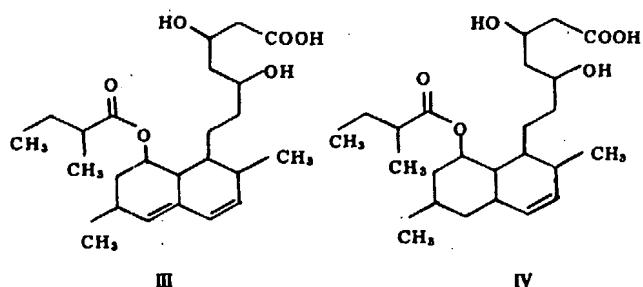
より選んだ化合物、又は、製薬的に適當なその塩あるいは低級アルキルエステル、置換低級アルキルエステルでその置換基がフェニル、ジメチルアミン、アセチルアミンであるもの。

10. カチオンが、アンモニア、エチレンジアミン、N-メチルグルカミン、リジン、アルギニン又はオルニチンである特許請求の範囲第9項の化合物における製薬的に適當な塩。



より選んだ化合物からなることを特徴とする薬剤組成物。

21. 製剤担体及び有効量の式 :



11. 特許請求の範囲第9項の化合物IIIのアンモニウム塩。

12. 特許請求の範囲第9項の化合物IVのアンモニウム塩。

13. 特許請求の範囲第9項の化合物の低級アルキルエステル及び置換低級アルキルエステル。

14. 特許請求の範囲第9項の化合物IIIのエチルエステル。

15. 特許請求の範囲第9項の化合物IVのエチルエステル。

16. 式Iを有する特許請求の範囲第8項の化合物。

17. 式IIを有する特許請求の範囲第8項の化合物。

18. 式IIIを有する特許請求の範囲第9項の化合物。

19. 式IVを有する特許請求の範囲第9項の化合物。

20. 製剤担体及び有効量の式 :

より選んだ化合物、あるいは、製剤的に適當な塩、又は低級アルキルエステル、置換低級アルキルエステルでその置換基が、フェニル、ジメチルアミノ、アセチルアミノのもの、からなることを特徴とする薬剤組成物。

22. カチオンがアンモニア、エチレンジアミン、N-メチルグルカミン、リジン、アルギニン、又は、オルニチンから由来する薬剤的に適當な塩を化合物とする特許請求の範囲第21項の組成物。

23. 化合物IIIのアンモニウム塩を化合物とする特許請求の範囲第21項の組成物。

24. 化合物IVのアンモニウム塩を化合物とする特許請求の範囲第21項の組成物。

25. 化合物が低級アルキルエステル又は置換低級アルキルエステルである特許請求の範囲第21項の組成物。

26. 化合物IVのエチルエステルを化合物とする特許請求の範囲第21項の組成物。

27. 化合物IVのエチルエステルを化合物とする特許請求の範囲第21項の組成物。

28. 化合物が式、Iを有するものである特許請求の範囲第20項の組成物。

29. 化合物が式IIを有するものである特許請求の範囲第20項の組成物。

30. 化合物が式、IIIを有するものである特許請求の範囲第21項の組成物。

31. 化合物が式IVを有するものである特許請求の範囲第21項の組成物。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本願発明の化合物Iの<sup>1</sup>H NMRスペクトル図である。

第2図は前記化合物IのIRスペクトル図である。

第3図は本願発明の化合物IIの<sup>1</sup>H NMRスペクトル図である。

第4図は前記化合物IIのIRスペクトル図である。

FIG. 1

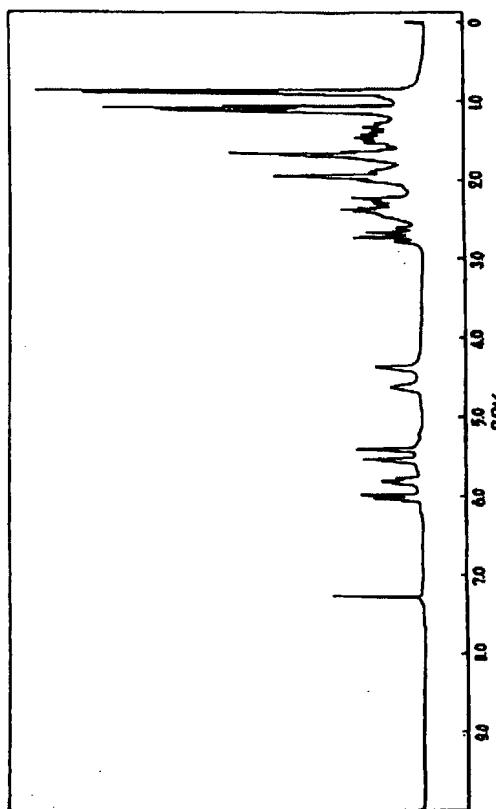


FIG. 2

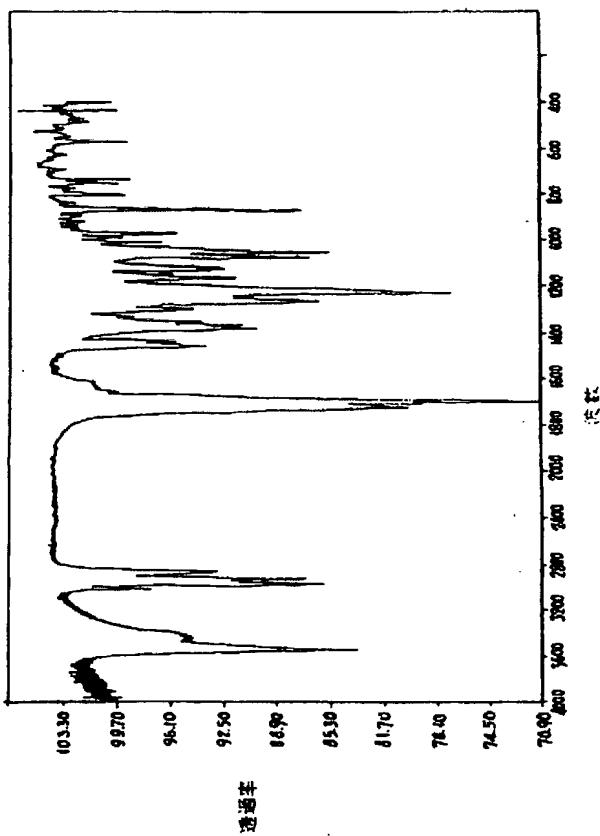


FIG. 3

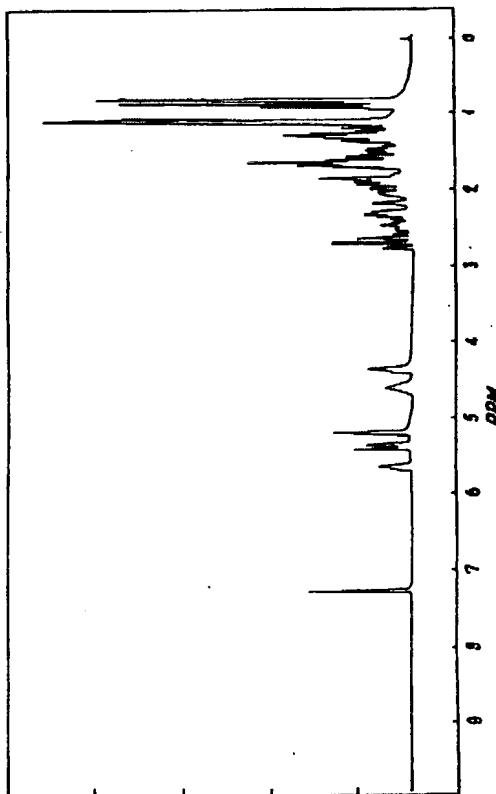
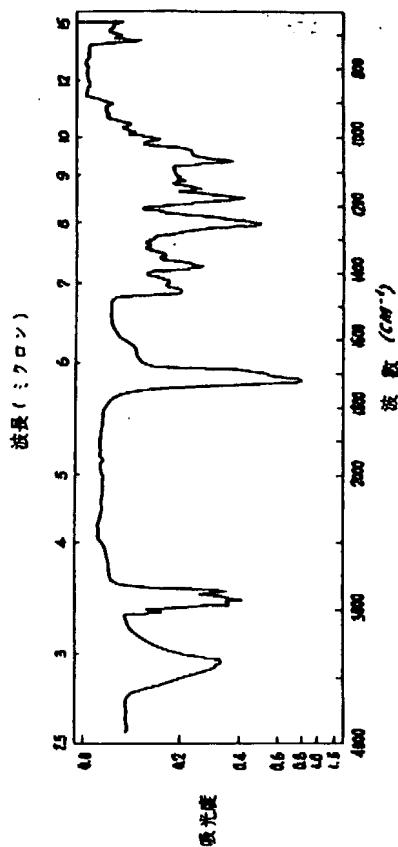


FIG. 4



## 第1頁の続き

⑤Int. Cl.<sup>3</sup> 識別記号 廈内整理番号  
 // (C 12 P 17/06 ③ ④  
 C 12 R 1/66 ) 114459  
 (C 12 P 7/62 )  
 C 12 R 1/66 )

優先権主張 ②1979年9月21日 ③米国(US)  
 ④77807  
 ②1980年1月23日 ③米国(US)  
 ④114459

⑦発明者 アルフレッド・ダブリュ・アル  
 パーツ  
 アメリカ合衆国07078ニュージ  
 ャーシイ・ショート・ヒルズ・  
 マーチンデール・ロード24  
 ⑦発明者 カール・エツチ・ホフマン  
 アメリカ合衆国07076ニュージ  
 ャーシイ・スコット・ブレイン  
 ズ・マーチン・アヴェニュー15  
 70

⑦発明者 ジョージ・アルバース・ショー  
 ンバーグ  
 アメリカ合衆国08540ニュージ  
 ャーシイ・プリンストン・タイ  
 ソン・レーン30  
 ⑦発明者 ヘンリー・ジョシュア  
 アメリカ合衆国10314ニューヨ  
 ーク・ステイテン・アイランド  
 ・ウッド・ワード・アヴェニュー  
 -256  
 ⑦発明者 マリア・ビー・ロペツ  
 アメリカ合衆国07208ニュージ  
 ャーシイ・エリザベス・スプリ  
 ングフィールド・ロード214